

ZÁRÓJELENTÉS

Intesztinális gyulladás ozmotikus regulációja

Nyilvántartási szám: OTKA T 46520

Projekt időtartama: 2004.01.01-2007.12.31.

Témavezető: Dr. Haskó György

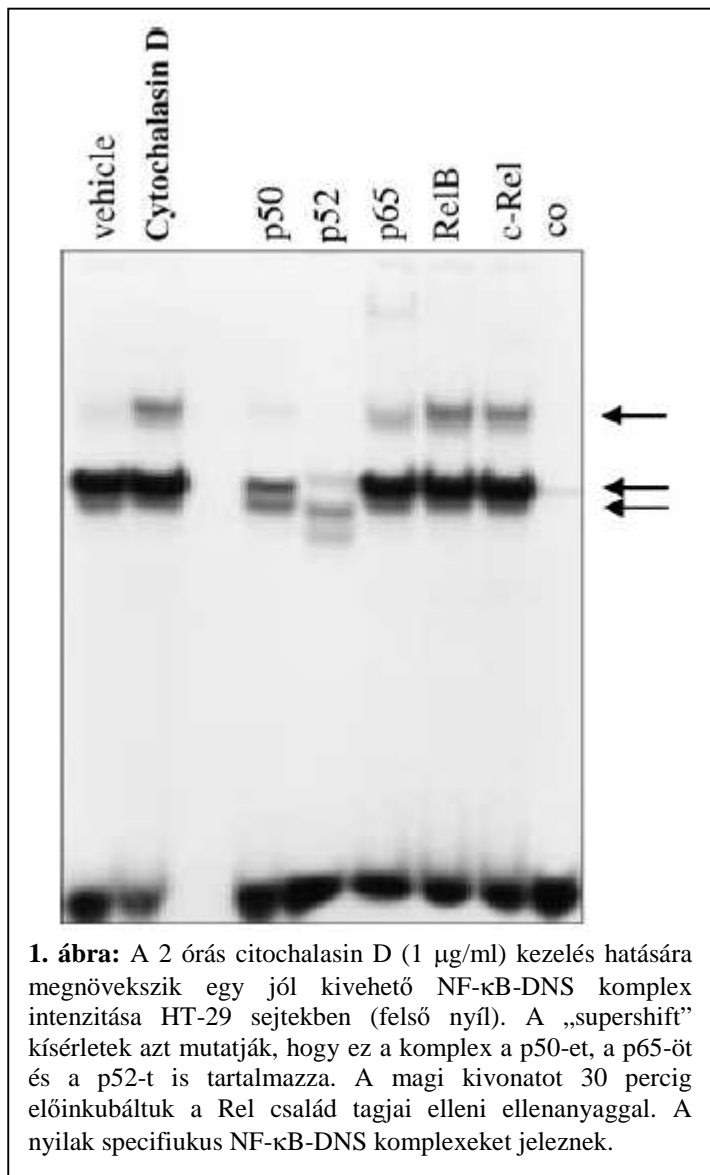
1. Kutatási eredmények

A projekt során először azt vizsgáltuk, milyen módon indukálja a hiperozmoláris környezet az intesztinális epiteliális sejtek gyulladásos válaszát. Mivel a sejtek citoszkeleton struktúrájában bekövetkező változások fontos összetevői a sejtek hiperozmoláris környezetre adott válaszreakciójának, elsőként azt vizsgáltuk, hogy a sejt aktin citoszkeletonjának diszrupciója képes-e utánózni a hiperozmoláris környezet gyulladáskeltő hatását. A vizsgálatokat a HT-29 és a Caco-2 humán vastagbélrák sejtvonalakon végeztük. A sejteket először citochalasin D-vel (1 µg/ml), egy prototipikus aktint romboló ágenssel kezeltük, és azt kaptuk, hogy a kezelés hatására megnő a különböző NF-κB DNS kötő komplexek intenzitása (1. ábra), míg az NF-κB-t gátló IκB részleges degradációt mutatott (2. ábra).

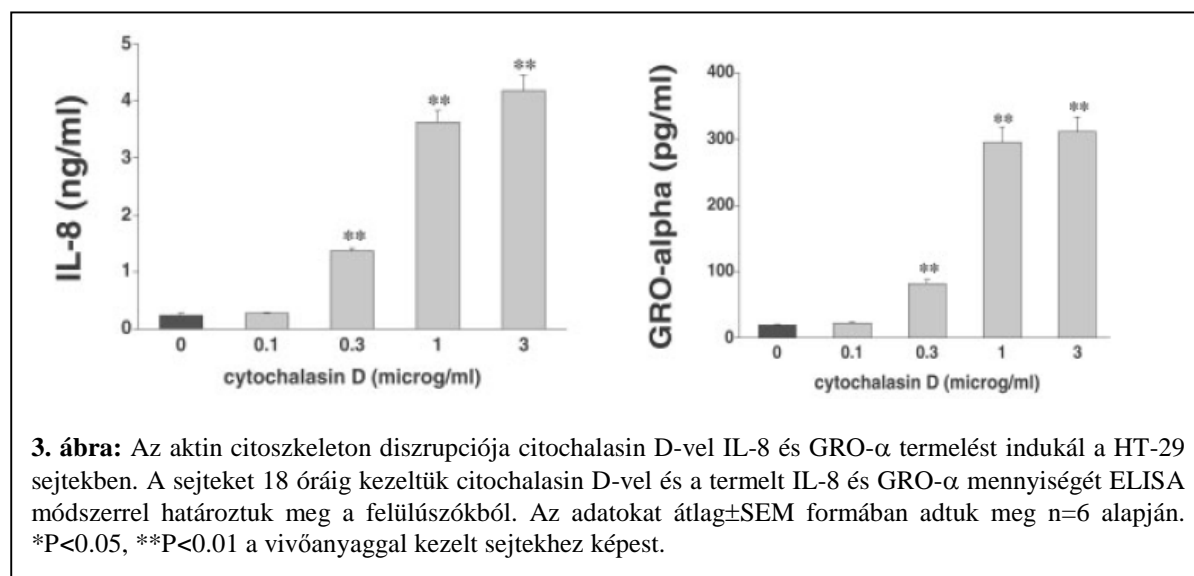
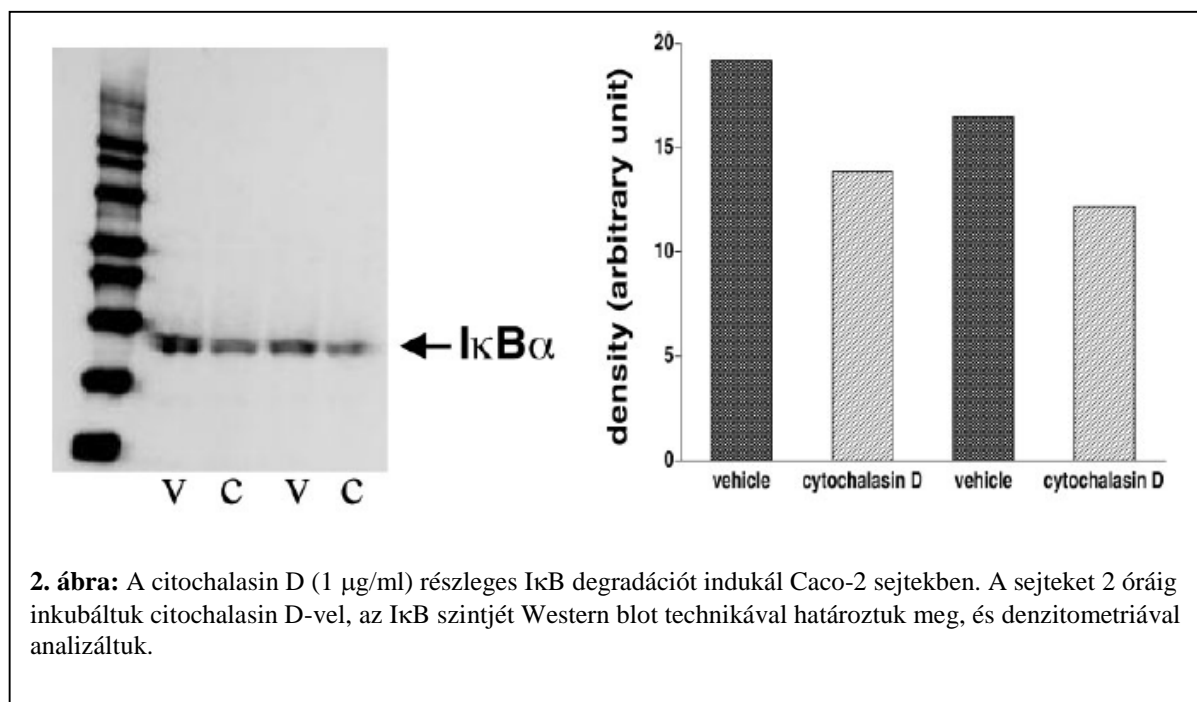
Ezzel párhuzamosan a citochalasin D dózisfüggően (0.3-3 µg/ml) növelte az intesztinális epitelsejtek interleukin (IL)-8 és GRO-α termelését is (3. ábra). Mivel az aktin citoszkeleton diszrupciója aktiválja a p38-at, és a p38 fontos regulátora az intesztinális epitel sejtek IL-8 termelésének, ezért vizsgáltuk a p38 szerepét az aktin diszrupció okozta IL-8 termelésben. Eredményeink azt mutatják, hogy a citochalasin D kezelés hatására megnő a p38 aktivált, foszforilált formájának mennyisége (4.A ábra), míg a szelektív p38 inhibitor SB203580 dózisfüggően (0.03-1 µM) gátolja a citochalasin D által kiváltotta IL-8 termelést (4.B ábra).

A folytatásban az eredetileg tervezett *in vitro* kísérletek helyett áttértünk az *in vivo* kísérletekre, hogy az így nyert adatokkal közelebb kerüljünk annak lehetőségéhez, hogy eredményeink mihamarabb hasznosíthatóak legyenek a klinikumban. Újabb klinikai vizsgálatok kimutatták, hogy a hipotenzív traumás pácienseknél hipertóniás sóoldattal (HTS) történő újraélesztés után statisztikailag alacsonyabb az „adult respiratory distress syndrome”

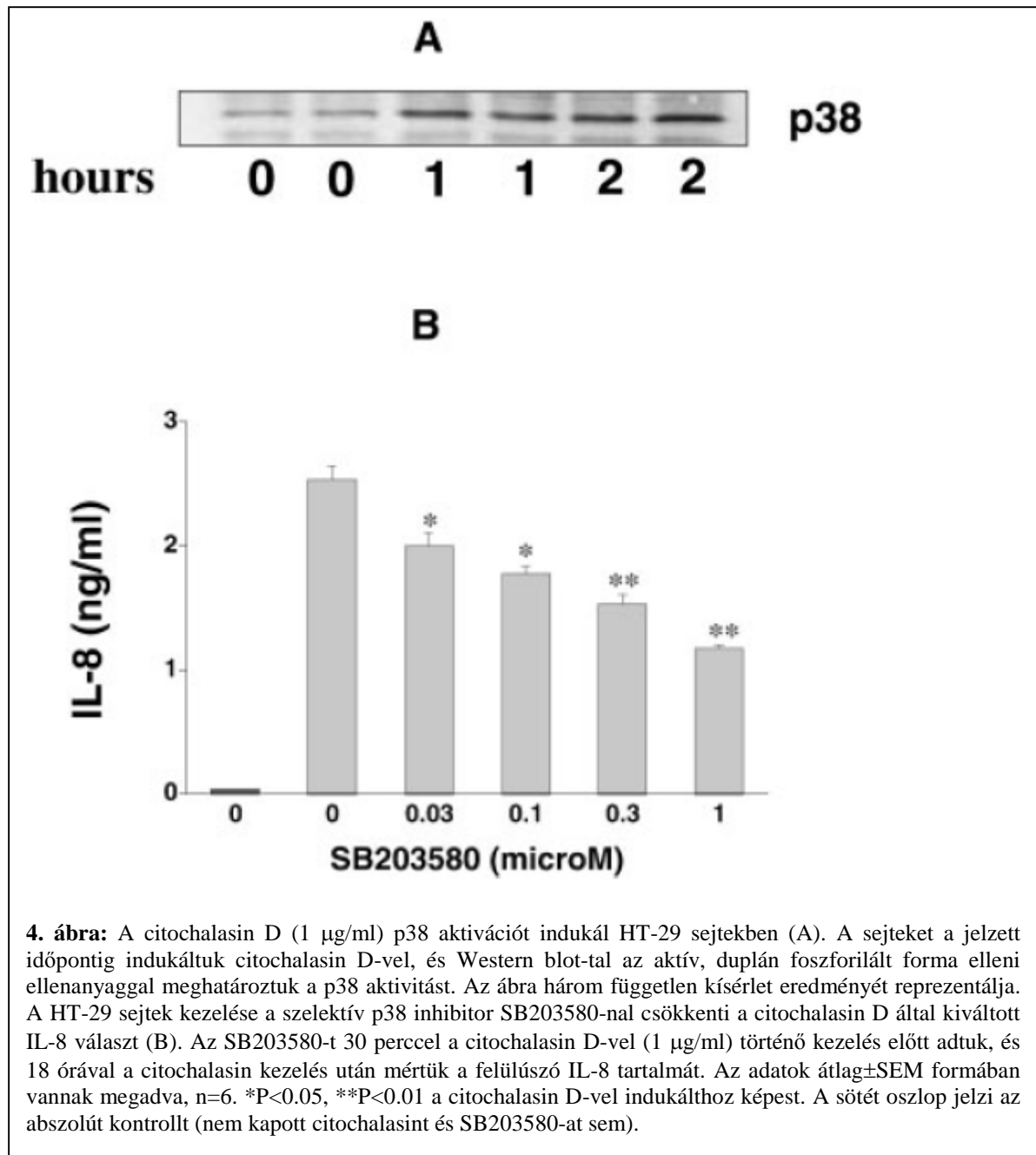
(ARDS), a veseelégtelenség és a koagulopátia incidenciája, mint az izotóniás folyadékkal újraélesztett pácienseknél. Habár nem ismert, hogyan fejti ki előnyös hatásait a HTS-sel történő újraélesztés, fontos lehet, hogy ellentétben az izotóniás újraélesztési technikákkal, a HTS előnyösen modulálja a sérülés utáni gyulladásos válaszokat. Ennek vizsgálatára felnőtt hím Sprague-Dawley patkányokon laparotómiával traumát váltottunk ki,



majd amiloriddal, egy Na^+/H^+ -pumpa és epitélsejt Na^+ -csatorna gátlóval kezeltük őket, és 30 perccel később egy juguláris véna katéteren keresztül vérzéses sokkot (T/HS), illetve álsokkot (T/SS) idéztünk elő bennük. A sokk/álsokk periódus után 90 perccel az állatokat Ringer-laktát oldattal (RL), vagy 7.5% HTS-sel újraélesztettük. Három órával a 90 perces sokk vagy álsokk periódus vége után bélkárosodást, tüdő permeabilitást, tüdő szövettant, pulmonáris neutrofil szekvesztrációt, neutrofil CD11b expressziót és vörösvértest-merevséget néztünk.



Eredményeink azt mutatják, hogy a HTS-sel újraélesztett T/HS állatokban kisebb a ileális mukóza károsodásának a valószínűsége, mint az RL-lel újraélesztettekénél, amit a károsodott ileális bolyhok kisebb aránya mutat (5. ábra). Ugyanakkor az amilorid limitálta a sérült bolyhok számát az RL-lel, de nem a HTS-sel újraélesztett állatokban (5. ábra), míg a T/HS-indukált boholy ödémát mind a HTS, mind az amilorid csökkentette (6. ábra).



T/HS hatására az állatokban akut tüdőkárosodás lép fel, amit az Evans blue festék iránt mutatott megnövekedett permeabilitás, a bronchoalveoláris mosófolyadékban a plazmafehérje arány növekedése, valamint a neutrofilek jelenlétére utaló megnövekedett mieloperoxidáz (MPO) aktivitás jelez (7. ábra). A tüdőkárosodás mértéke a HTS-sel újraélesztett állatokban kisebb, mint az RL-lel újraélesztettekben, és az amilorid tovább mérsékli azt (7. ábra). Ugyanakkor, a HTS és az amilorid is csökkenti a tüdőben a T/HS-indukált intersticiális ödémát, neutrofil infiltrációt és a vörösvérsejt extravazációt (8. ábra). A neutrofil infiltráció csökkenése feltehetőleg összefüggésben áll a neutrofilek csökkent CD11b expressziójával, amely molekula fontos szerepet játszik a neutrofilek adhéziójában endotél sejtekhez, bár ez a csökkenés csak a HTS-sel újraélesztett állatokban volt megfigyelhető, míg az amilorid nem csökkentette a CD11b expressziót (1. táblázat).

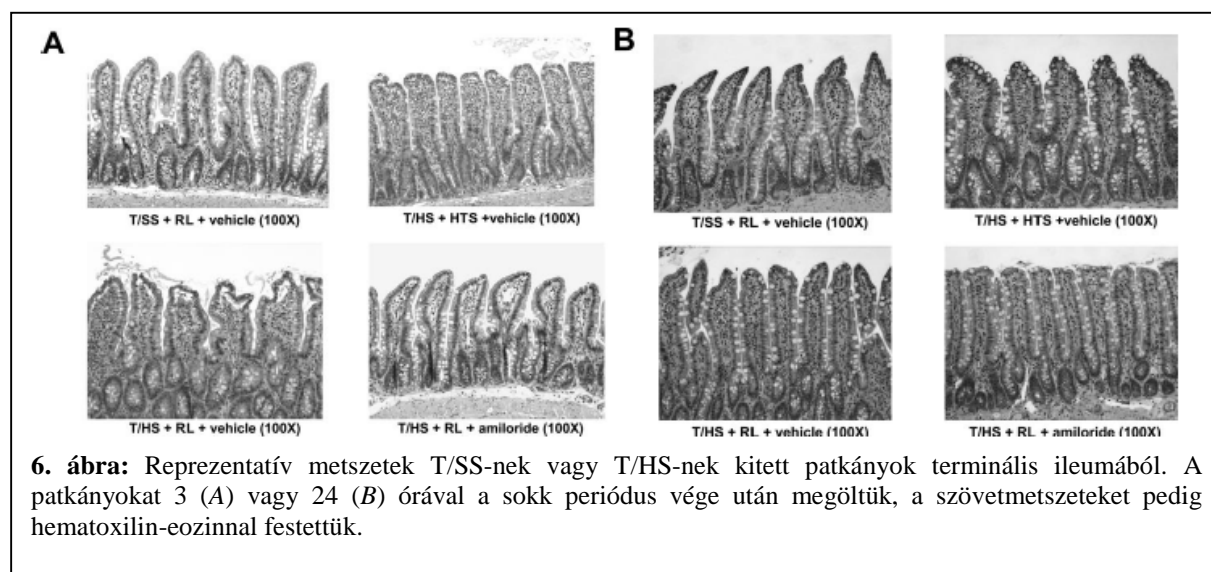
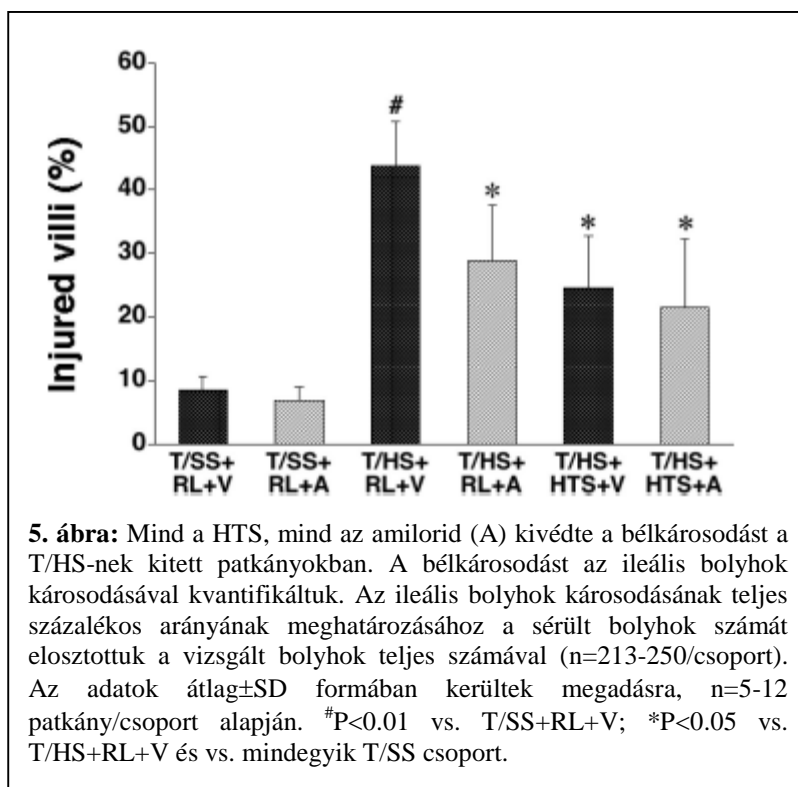
A vörösvértestek deformabilitása minden csoportban jelentősen csökkent a sokk periódus végére a reperfúzió előtt. A HTS adása részben visszaállította a T/HS-indukált

vörösvértest deformabilitás csökkenést, míg az RL nem. Mindazonáltal az amilorid egyik csoportban sem javította a vörösvértest deformabilitást (2. táblázat).

Habár tehát az amilorid javította a vékonybél-károsodás szövettani jeleit, az nem ismert, hogy ez a védő hatás vezet-e a bél permeabilitásának csökkenéséhez.

További fontos kérdés, hogy az amilorid csökkenti-e a mezenterikus nyirok toxicitását, ezáltal mérsékelve a tüdő károsodását. Munkánknak ebben a szakaszában azt vizsgáltuk, hogyan csökkenti az amilorid a bél

permeabilitását T/HS után, hogyan moderálja a mezenterikus nyirok hatását a neutrofil aktivációra, és hogyan befolyásolja a mezenterikus nyirok endotél sejtekre kifejtett károsító hatását. Ehhez először is a T/HS-indukált állatokból származó mezenterikus nyirokot gyűjtöttünk, majd MTT-alapú sejt citotoxicitás assay-vel vizsgáltuk ennek toxikus hatását humán köldökvéna endotél sejtekre (HUVEC). A hordozóval kezelt T/HS állatokból származó nyirok mintegy 70%-os életképesség csökkenést okozott a sejtekben a hordozóval kezelt álsokkolt (T/SS) állatokból vagy a sokk periódus előtt nyert nyirokkal kezelt sejtekéhez viszonyítva. Az amiloriddal kezelt T/HS-indukált állatokból sokk után kinyert nyirok hasonlóan csökkentette a sejtek életképességét, mint a hordozóval kezelt T/HS-indukált állatokból kinyert (9. ábra).

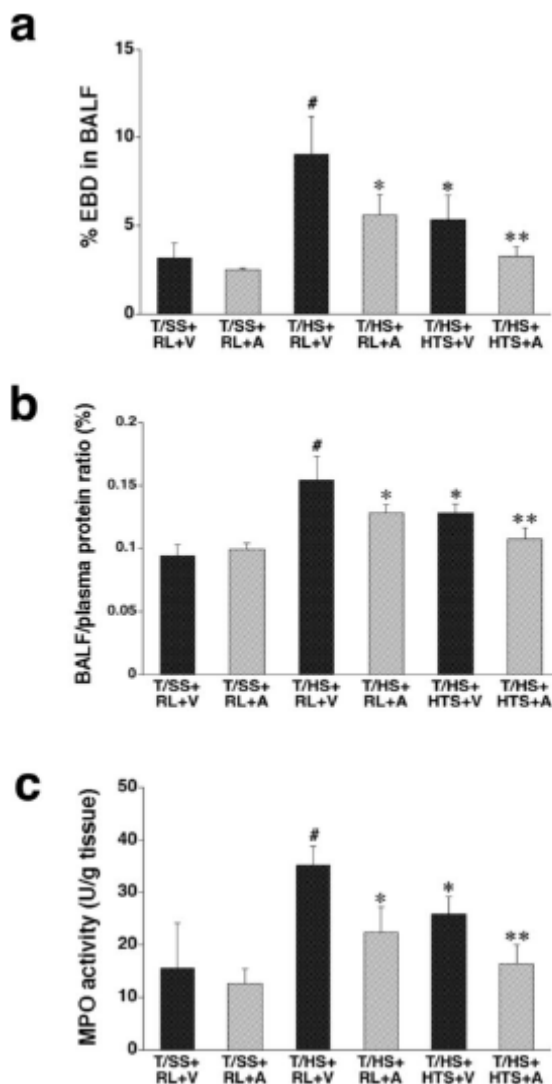


A következőkben a különböző H/TS-indukált állatokból származó nyiroknak a HUVEC sejtréteg permeabilitására gyakorolt hatását vizsgáltuk 0.05%-os 10-kDa dextrán-rhodamin segítségével. A T/HS sokk utáni nyiroknak kitett HUVEC sejtréteg permeabilitása számottevően magasabb, mint a T/SS vagy T/HS sokk előtti nyirokkal kezelt sejteké. Mindazonáltal a T/HS állatok amilorid kezelése nem csökkenti a sokk utáni T/HS nyirok HUVEC permeabilitást fokozó képességét (10. ábra).

Mivel tudott, hogy a T/HS állatokból származó mezenterikus nyirok képes előaktiválni a neutrofileket, ami megnövekedett „respiratory burst”-öt eredményez, így vizsgáltuk az amilorid kezelés hatását erre is. Ehhez az izolált neutrofileket először dihidro-rhodaminnal (15 ng/ml) inkubáltuk, majd forbol mirisztát acetáttal (PMA, 270 ng/ml) indukáltuk, és áramlási citometriával mértük a „respiratory burst” változását. Az így kapott eredményeink azt mutatják, hogy az amiloriddal kezelt T/HS állatokból nyert sokk utáni nyirok előaktiváló hatása szignifikánsan kisebb, mint a hordozóval kezelt T/HS patkányokból vett nyiroké (11. ábra). Hasonlóképp az amiloriddal kezelt állatokból származó T/HS sokk utáni plazma gyulladáskeltő hatása is alacsonyabb, mint a hordozóval kezelt T/HS állatok, vagy a T/SS állatok plazmájának a gyulladáskeltő hatása (12. ábra).

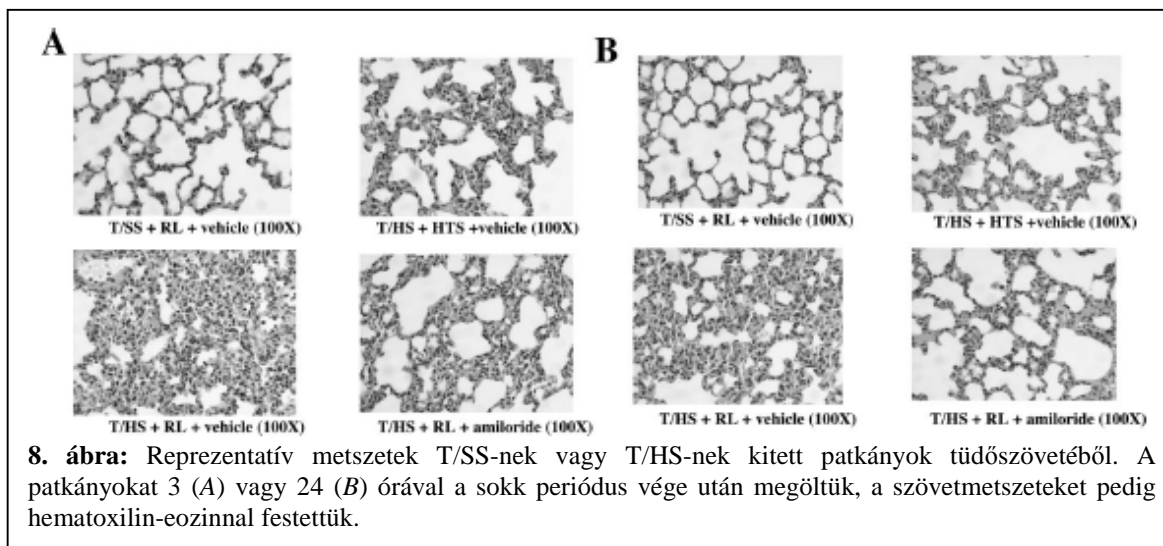
Minthogy az amilorid a korábbi kísérletekben mérsékelte a mikrobolyhok károsodását a T/HS-indukált állatokban, de ez nem szükségszerűen jár a bél permeabilitásának megváltozásával, ezért az FD-4 fluoreszcens festéknek a bélcsatornából a keringési rendszerbe történő átjutását nyomon követve meghatároztuk a bél permeabilitását is. A T/HS állatokban a bél permeabilitásának jelentős mértékű növekedése figyelhető meg a T/SS állatokhoz képest, és a T/HS indukciónak ezt a hatását az amilorid kezelés szignifikánsan csökkenti (13. ábra).

Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az aktin citoszkeleton diszrupciója, ami fontos összetevője a sejtek hiperozmoláris környezetre adott válaszreakciójának, aktiválja az I κ B-NF- κ B rendszert más gyulladásos útvonalakkal együtt az



7. ábra: A HTS és amilorid (A) adása T/HS-nek kitett patkányoknak sokkal hatásosabb a tüdő védelmében, mint bármelyik ágens önmagában. A tüdő károsodását az Evans blue festék iránti permeabilitás (EBD, a), a bronchoalveoláris mosófolyadékban (BALF) plazma fehérje arány (b), és a neutrofilek jelenlétére utaló mieloperoxidáz (MPO) aktivitás (c) mérésével határoztuk meg. V, vivőanyag. Az oszlopok a csoportonként 5-8 állatból származó adatokat mutatják átlag \pm SD formában. [#]P<0.01 vs. T/SS+RL+V és T/SS+RL+A; ^{*}P<0.05 vs. T/HS+RL+V és vs. minden T/SS csoport; ^{**}P<0.01 vs. minden másik T/HS csoport.

intesztinális epiteliális sejtekben. Továbbá a sejtek ozmotikus viszonyainak fenntartásában fontos Na^+/H^+ -pumpák és Na^+ -csatornák gátlása amiloriddal, vagy a kis térfogatú hiperozmotikus sóoldattal történő újraélesztés a kezdeti bélkárosodás mérséklésével értékes stratégia lehet a sokk-indukált távoli szerv károsodások terápiájában. Azonban még amiloriddal végzett utókezeléses vizsgálatokra, valamint más sokk-modellek alkalmazására lesz szükség az amiloridnak a T/HS-indukált szervkárosodások kezelésében történő lehetséges klinikai hasznosításának meghatározásához.

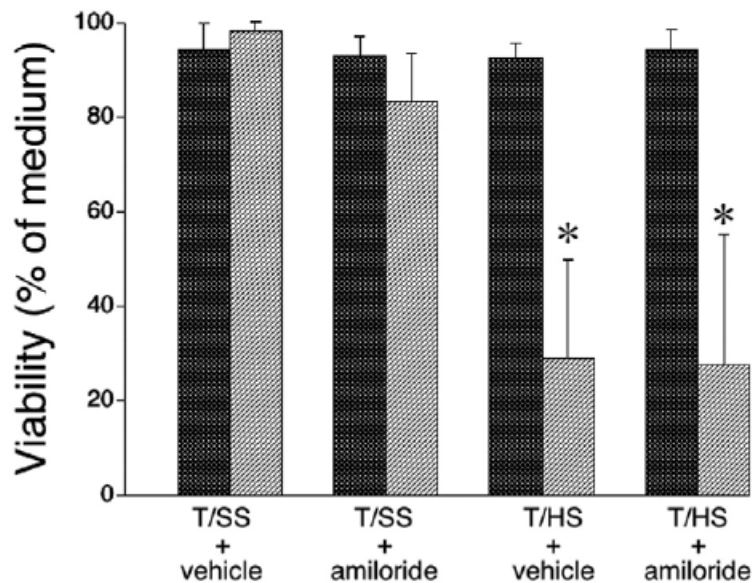


	sokk kezdete előtt	sokk és újraélesztés után
T/SS + RL + vivőanyag (n=6)	145 ± 24	240 ± 32
T/SS + RL + amilorid (n=6)	147 ± 26	236 ± 20
T/HS + RL + vivőanyag (n=8)	149 ± 22	637 ± 88 ^a
T/HS + RL + amilorid (n=8)	148 ± 17	568 ± 71 ^a
T/HS + HTS + vivőanyag (n=8)	155 ± 24	375 ± 53 ^b
T/HS + HTS + amilorid (n=8)	151 ± 36	371 ± 35 ^b

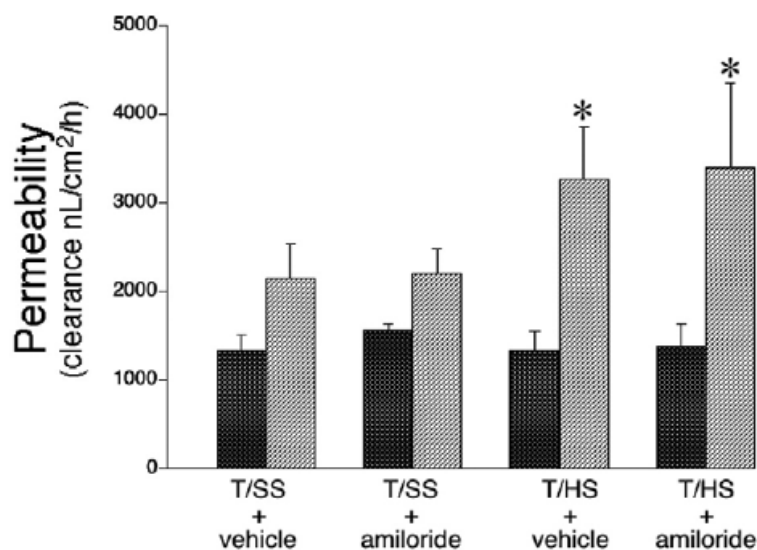
1. táblázat: CD 11b expresszió T/HS-nek vagy T/SS-nek kitett, HTS-sel vagy RL-lel újraélesztett és amiloriddal vagy vivőanyaggal kezelt patkányokból származó neutrofileken. ^aP < 0.01 vs. összes többi csoport; ^bP < 0.05 vs. T/SS csoportok és T/HS + RL + vivőanyag, vagy T/HS + RL + amilorid. Az adatok az átlagos fluoreszcencia intenzitást mutatják átlag±SD formában.

	sokk kezdete előtt	90 perccel a sokk kezdete után	3 órával az újraélesztés után
T/SS + RL + vivőanyag (n=6)	0.067 ± 0.006	0.066 ± 0.004	0.066 ± 0.004
T/SS + RL + amilorid (n=7)	0.067 ± 0.005	0.067 ± 0.004	0.065 ± 0.004
T/HS + RL + vivőanyag (n=6)	0.069 ± 0.006	0.046 ± 0.005 ^a	0.041 ± 0.004 ^a
T/HS + RL + amilorid (n=7)	0.066 ± 0.003	0.046 ± 0.004 ^a	0.045 ± 0.003 ^a
T/HS + HTS + vivőanyag (n=6)	0.067 ± 0.004	0.047 ± 0.001 ^a	0.058 ± 0.006 ^b
T/HS + HTS + amilorid (n=6)	0.069 ± 0.006	0.048 ± 0.006 ^a	0.057 ± 0.002 ^b

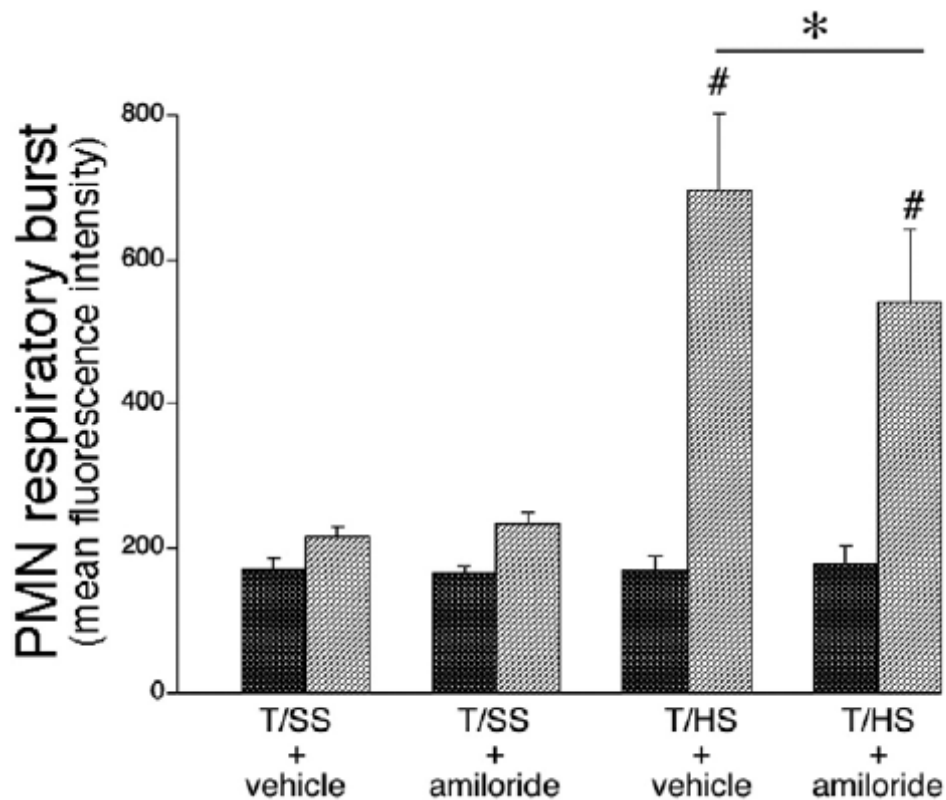
2. táblázat: Vörösvérsejtek deformabilitása T/HS-nek vagy T/SS-nek kitett, HTS-sel vagy RL-lel újraélesztett és amiloriddal vagy vivőanyaggal kezelt patkányokban. ^aP<0.01 vs. T/HS előtt; ^bP<0.01 vs. sokk előtti és 90 perccel a T/HS kezdete utáni. Az adatok átlag±SD formában vannak megadva.



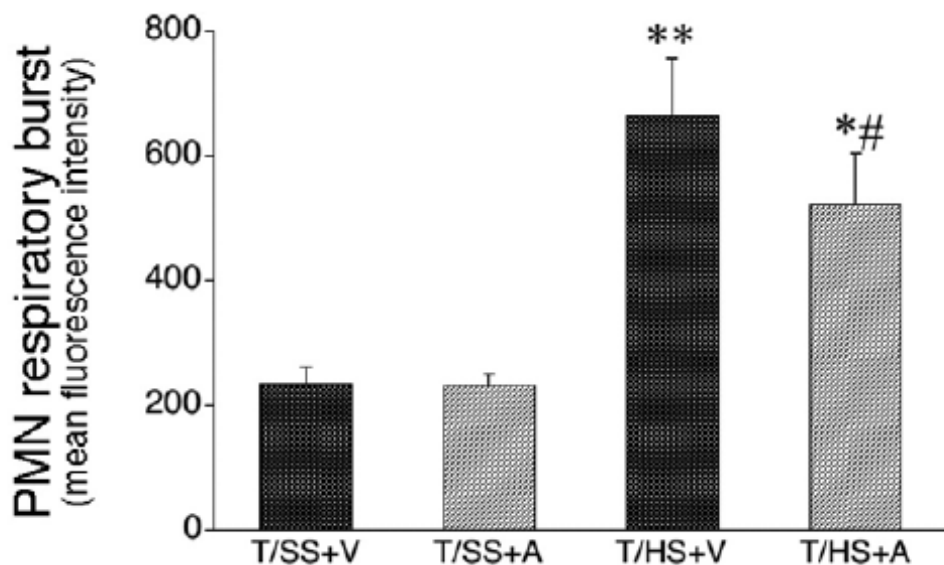
9. ábra: A HUVEC sejtek inkubálása vivőanyaggal kezelt T/HS állatokból származó nyirokkal jelentős csökkenést okozott a HUVEC sejtek életképességében 18 órával a kezelés után mérve. A HUVEC sejtek életképessége akkor sem változott, amikor amiloriddal kezelt T/HS állatok nyirokját adtuk a sejtekhez. Az életképességet a kontroll %-ában adtuk meg. Fekete oszlopok, sokk előtti; világos oszlopok, sokk utáni. Az adatok átlag \pm SD formában vannak megadva 4-6 patkány/csoport alapján. *P<0.001 vs. minden trauma előtti és T/SS trauma utáni csoport.



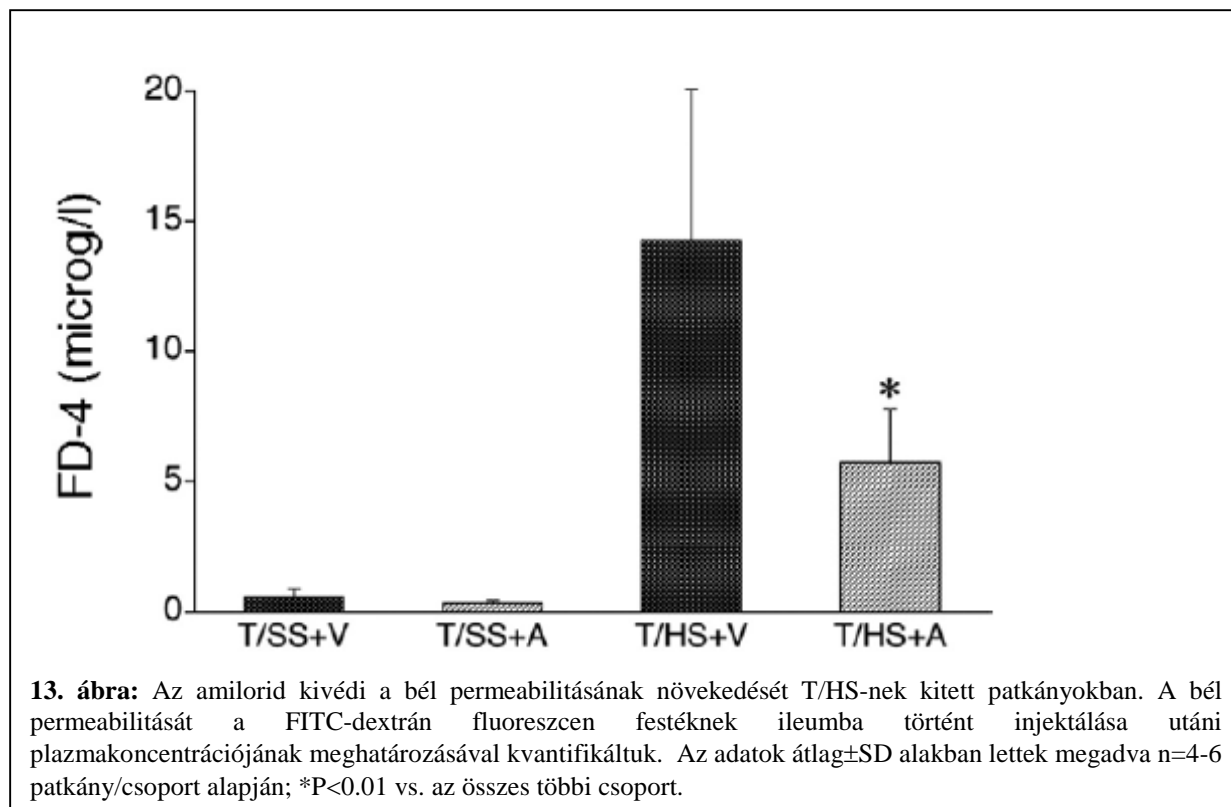
10. ábra: Az állatok kezelése amiloriddal nem védte ki a 30%-os nyiroknak a HUVEC sejtek 10-kDa rhodamin dextránnal szembeni permeabilitására gyakorolt növelő hatását. Fekete oszlopok, sokk előtti; szürke oszlopok, sokk utáni. Az adatok átlag \pm SD alakban lettek megadva n=4-6 patkány/csoport alapján; *P<0.01 vs. minden trauma előtti csoport, <0.05 vs. T/SS trauma utáni csoportok.



11. ábra: A T/HS-nek kitett állatok forbol mirisztát acetátra (PMA) adott “respiratory burst” válasza csökken amilorid kezelés után. A polimorfonukleáris sejteket (PMN) T/HS-nek vagy T/SS-nek kitett és amiloriddal vagy vivőanyaggal kezelt patkányokból származó 5% nyirokkal kezeltük. Fekete oszlopok, sokk előtti; szürke oszlopok, sokk utáni. Az adatok átlag±SD alakban lettek megadva n=4-6 patkány/csoport alapján; [#]P<0.01 vs. minden trauma előtti csoport, *P<0.05: T/HS-vivőanyag vs. T/HS-amilorid csoport, mindkettő trauma után.



12. ábra: A PMN-eket T/HS-nek vagy T/SS-nek kitett és amiloriddal vagy vivőanyaggal kezelt patkányokból származó 25%-os plazmával kezeltük, és azt kaptuk, hogy a T/HS-nek kitett állatok forbol mirisztát acetátra (PMA) adott “respiratory burst” válasza csökken amilorid kezelés után. Az adatok átlag±SD alakban lettek megadva n=4-6 patkány/csoport alapján; ^{**}P<0.001 vs. T/SS+V (vivőanyag) és T/SS+A (amilorid); *P<0.01 vs. T/SS+V és T/SS+A; [#]P<0.05 vs. T/HS+V.



2. A kutatás folyamán bekövetkezett személyi változások

A pályázat végrehajtását Dr. Haskó György vezető kutató mellett Csóka Balázs és Papp Lilla biológusok kezdték el. A projekt végrehajtásának első éve után Csóka Balázs külföldi tanulmányútra ment. Az ő pályázatban ellátott feladatait ezért egy új kutató, Selmeczy Zsolt biológus vette át, aki a pályázathoz csatlakozás időpontjában 6 éves szakmai tapasztalattal bírt, és a pályázathoz csatlakozás évében sikerrel védte meg doktori téziseit. Ez a személyi változás a kutatás folyamatát a tervezettekhez képest érdemben nem befolyásolta.